



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of : **Confirmation No. 6872**
Akio YAMANE : Docket No. 2002-0401A
Serial No. 10/088,598 : Group Art Unit 1634
Filed March 21, 2002 : Examiner Sally A. Sakelaris
HYBRIDIZATION SELF-RECOGNITION : **Mail Stop: RCE**
PROBE

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant in the above-entitled application hereby claims the date of priority under the International Convention of Japanese Patent Application No. 1999-268745, filed September 22, 1999, as acknowledged in the Declaration of this application.

A certified copy of said Japanese Patent Application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

Akio YAMANE

By Warren M. Cheek, Jr.
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicant

WMC/JFW/ksh
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
February 4, 2005

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEES FOR THIS PATENT TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 20-0370

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 1999年 9月22日
Date of Application:

出願番号 平成11年特許願第268745号
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 1999-268745]

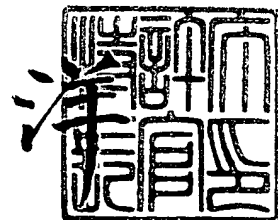
願人 湧永製薬株式会社
Applicant(s):

BEST AVAILABLE COPY

2005年 1月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

出証番号 出証特2005-300116

【書類名】 特許願

【整理番号】 12175201

【提出日】 平成11年 9月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション自己認識型プローブ

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 広島県高田郡甲田町下甲立 1 6 2 4 湧永製薬株式会社
内

【氏名】 山 根 明 男

【特許出願人】

【識別番号】 000250100

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原四丁目 5 番 3 6 号

【氏名又は名称】 湧永製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064285

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐 藤 一 雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067079

【弁理士】

【氏名又は名称】 小 野 寺 捷 洋

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487

【弁理士】

【氏名又は名称】 中 村 行 孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342

【弁理士】

【氏名又は名称】 横 田 修 孝

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004444

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション自己認識型プローブ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光を放出する標識物質、および
標識物質から放出された光を吸収し、かつプローブと相補鎖核酸とのハイブリダイゼーションにより光の吸収が妨げられる光吸収性物質
を担持してなる核酸からなるプローブ。

【請求項 2】

標識物質が、蛍光物質、遅延蛍光物質、または化学発光物質である、請求項 1 のプローブ。

【請求項 3】

光吸収性物質が、標識物質から放出された光を吸収し、かつ二本鎖核酸とインターカレートするかあるいは二本鎖核酸と特異的に結合する物質である、請求項 1 に記載のプローブ。

【請求項 4】

標識物質がフルオレセインであり、光吸収性物質がピレン、クマリン、またはアクリジンである、請求項 1 に記載のプローブ。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 項のいずれか 1 項に記載のプローブが固定化された核酸検出用固相担体。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 項のいずれか 1 項に記載のプローブと試料とを接触させ、次いで標識物質から放出される光を測定することを含んでなる、核酸の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は標識された核酸検出用プローブに関し、更に詳細には、標識物質から

の光放出（例えば蛍光）が光吸収性物質により制御されているプローブに関する

。

【0002】

背景技術

近年の遺伝子医学の進歩は著しく、ヒト遺伝子の全塩基配列の解読も現実のものとなってきた。また、遺伝子の多型と疾患に関するデータも日々刻々と蓄積されており、ヒト遺伝子全領域の多型解析も進展しつつある。一方、ヒトの病気を引き起こすウイルスや細菌の遺伝子検査は実用化され、医療に貢献している。このような状況下、遺伝子検査技術に関する期待は大きく、更なる簡便化、低コスト化が求められている。

【0003】

従来から遺伝子を検出する方法としてプローブを用いた方法がある。一般的には、検出しようとする核酸を含む試料を固相に固定し、これに相補的な標識物を導入した核酸（以下検出しようとする核酸に相補的な核酸をプローブと呼ぶ）をハイブリダイズさせて二本鎖を形成させ、固相を洗浄した後、固相にトラップされた核酸中の標識物を検出することにより試料中の目的核酸の有無を調べる方法である。また、逆に試料核酸を標識し、固相に固定したプローブとの間で相補鎖を形成させて検出する方法もある。これらの方法は確立され信頼できる方法ではあるが、過剰の試料や、過剰のプローブ、あるいは検出のための過剰の試薬等を必要とし、また洗浄操作が煩雑で遺伝子検査普及の一つの妨げともなっている。

【0004】

これらの問題を克服するために種々の方法が検討されているが、いずれも固液の分離を必要としない均一系ハイブリダイゼーション (homogeneous hybridization) と呼ばれるものである。具体的な方法の一つとしてアクリジニウムエステルを用いるハイブリダイゼーションプロテクション法がある (Arnold et.al. Clin. Chem. 35, 1588-1594 (1988))。この方法はプローブにアクリジニウムエステルが導入されており、プローブが相補鎖を形成した時の方が相補鎖を形成しない場合よりアルカリによる加水分解に抵抗性を示すことと利用した方法で、ハイブリダイゼーションのあとアルカリによる加水分解を行い分解されないで残った

アクリジニウムエステルを化学発光で検出する方法である。この方法は固液の分離を必要としない点で優れており、広く実用化されている。しかしながら、依然ハイブリダイゼーション後の加水分解などの処理が必要であることや、アクリジニウムエステルが高温で分解すること、また化学発光は一度限りであることから更なる応用を困難にしている。一方、均一系ハイブリダイゼーションの典型的方法としてエネルギー転移を利用する方法が開発されてきた (Kricka L. J. Non isotopic DNA Probe Techniques p311-352, Academic Press, Inc. (1992))。代表的な方法としては一方のプロープの 5' 末端付近に標識が導入されており、もう一方のプロープの 3' 末端付近には別の標識が導入されている二つのプロープを利用し、両方のプロープに相補的な核酸が存在する時のみハイブリダイゼーションによって二種の標識が接近でき、その時の二種の標識間で起こるエネルギー転スファを利用する方法である。これらの方法はいずれも目的とする遺伝子が存在する時に蛍光が消光するか、あるいは一方の標識の蛍光を他方の蛍光物質が吸収して蛍光を発するかであり、バックグラウンドの影響など種々の問題がある。

【 0 0 0 5 】

これらの問題を解決すべく、エネルギー転スファを利用した新たな方法が開発されている。その一つの方法はTaqManTM法と呼ばれるもので (Livak, K. J. et. al. PCR Methods Appl. 4, 357-362 (1995))、オリゴヌクレオチドにドナーとなる蛍光標識とアクセプターとなる蛍光標識の二つを導入しておき、このオリゴヌクレオチドが相補的な配列と相補鎖を形成している場合のみDNAポリメラーゼの 5' から 3' 方向へのエキソヌクレアーゼ活性により分解されることを利用する方法である。すなわち、二種の標識が一つのオリゴヌクレオチド上に存在する時はエネルギー転スファを起こすのに十分近い位置にあり、一方の蛍光物質の蛍光は他方の蛍光物質に吸収され、蛍光が観察されない状態にある。しかし、DNAポリメラーゼの 5' から 3' 方向へのエキソヌクレアーゼにより分解されると二種の標識は別々の分子として存在することになり、エネルギー転スファを起こすことができなくなり、蛍光が観察される状態となる。この方法はポリメラーゼチェーン反応と組合わせた方法として普及しているが、

一塩基の置換を検出できるほど特異性はない。

【0006】

さらに別な方法としてMolecular Beacon法 (Kramer F. R. et. al. Nature Biotechnology 49-53 (1988)) がある。この方法は、オリゴヌクレオチドの両末端に蛍光のアクセプターとドナーを導入しておき、さらにその両末端にはターゲットと相補的な配列以外の余分な配列が付加されており、ターゲットが存在しない時は両末端の余分な配列でヘアピンを形成している。すなわち、ヘアピンの形成により二種の標識は十分近い位置にありエネルギー転送を起すことができる。一方、このオリゴヌクレオチドに相補的なターゲットが存在する場合にはターゲットと相補鎖を形成しヘアピン構造は破壊されエネルギー転送は起らない。つまり、ターゲットが存在しない場合には一方の蛍光物質の蛍光が他方の蛍光物質で吸収され、ターゲットが存在する場合はそのような消光は起らない状態となることを利用した方法である。

【0007】

さらにエネルギー転送法を利用する方法ではないが、二本鎖核酸に結合すると蛍光を発する物質をオリゴヌクレオチドに導入する方法も開発されているが (Ishiguro, T. et. al. Nucleic Acids Res. 24, 4992-4997 (1996))、バックグランドが高くなるなどの問題が考えられる。

【0008】

また、沢井らは (J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1994, 1337-1378) オリゴヌクレオチドの5' 末端にフルオレセインとインターカレーターであるアクリジンの両物質をスパーサーで結合した物質を導入し、オリゴヌクレオチドの二本鎖形成反応の挙動を調べている。すなわち、このオリゴヌクレオチドが一本鎖状態で存在する場合、アクリジンの吸収波長である340nmを照射すると、アクリジンからフルオレセインへのエネルギー転移が生じ、フルオレセインからの蛍光を観察することができる。一方このオリゴヌクレオチドが他の核酸と二本鎖を形成している場合、アクリジンは二本鎖核酸にインターカレートし、340nmの光を照射してもフルオレセインへのエネルギー転移を効率的に起こすことができず、よってフルオレセインからの蛍光を検出することができない。この方法は、蛍光

物質とインターカレーターを同時にオリゴヌクレオチドの末端に導入したという点で新規な方法であるが、一般的に、ある蛍光物質を励起し、それから生じる蛍光で第二の蛍光物質を励起して第二の蛍光物質から生じる蛍光を測定する方法は、第一の蛍光物質を励起した光で、第二の蛍光物質もある程度励起されることが多く、従ってバックグラウンドが高くなることが多い。また、相補鎖が存在しない時に蛍光を発し、相補鎖が存在するときに蛍光が減少するため一般的な診断方法には適していない。

【0 0 0 9】

【発明の概要】

本発明は、遺伝子の検出を固液の分離作業を必要としない簡易操作により短時間で高感度を実施できる核酸検出用プローブおよび核酸の検出法の提供をその目的とする。

【0 0 1 0】

本発明は、また、試料を標識せずに標的核酸を検出できる核酸検出用固相担体の提供をその目的とする。

【0 0 1 1】

本発明によるプローブは、光を放出する標識物質、および標識物質から放出された光を吸収し、かつプローブと相補鎖核酸とのハイブリダイゼーションにより光の吸収が妨げられる光吸収性物質を担持してなる核酸からなるものである。

【0 0 1 2】

本発明による核酸の検出法は、上記プローブと試料とを接触させ、次いで標識物質から放出される光を測定することを含んでなるものである。

【0 0 1 3】

本発明による核酸検出用固相担体は、上記プローブが固定化されたものである。

【0 0 1 4】

【発明の具体的説明】

本明細書において「標識物質」は、光化学的あるいは化学的にエネルギーを受け取ることにより励起状態となり、その励起状態から元の状態に戻る時にエネルギー

ギーを発するものであればいずれのものでもよい。光化学的に励起されるものとしてはフルオレセイン、テトラメチルローダミン等の蛍光物質が挙げられる。光化学的に励起されるものとしてはさらにランタニド錯体（例えば、ユウロピウム錯体）等の遅延蛍光物質が挙げられる（Hemmila, I. et. al. Drug Discovery Today 2, 373-381 (1997)）。化学的に励起されるものとしてはルミノール等の化学発光物質が挙げられる。

【0015】

本明細書において「光吸収性物質」はプローブと相補鎖核酸とのハイブリダイゼーションにより光の吸収が妨げられるものである。このような光吸収性物質としては、二本鎖核酸にインターカレートするもの（インターカレーター）や二本鎖核酸に特異的に結合するものが挙げられる。光吸収性のインターカレーターとしては、アクリジン、アントラセン、ピレンおよびそれらの誘導体が挙げられる。また、二本鎖核酸に選択的に結合する光吸収性の物質としてはエチジウムブロミド、Hoechst 33258が挙げられる。

【0016】

これら光吸収性物質は、標識物質から放出されたエネルギーを吸収する能力があればよく、それ自身吸収したエネルギーを光、例えば蛍光、として放出するものでも熱として放出するものでもいずれのものでもよい。

【0017】

本発明において用いる標識物質と光吸収性物質との組合せは、標識物質から光吸収性物質へのエネルギー転移が起こるものであれば特に限定されない。例えば、フルオレセインとピレン、フルオレセインとアクリジン、フルオレセインとクマリン、テトラメチルローダミンとピレンの組合せが挙げられる。

【0018】

標識物質および光吸収性物質は、核酸合成用に修飾されたものがあれば、そのまま自動合成機を用いてオリゴヌクレオチドの特定の場所に直接導入することができる。また、そのような試薬がない場合はオリゴヌクレオチド合成の過程でアミノ基、チオール基等を導入する核酸合成用試薬を用いてそれら官能基を導入し、そのあとそれら官能基と反応する官能基を導入した標識物を用いて標識するこ

とができる。それら試薬を用いて標識物を導入できる位置としては、オリゴヌクレオチドの 5' 末端あるいは 3' 末端、あるいはリン酸部分、さらには任意の位置の塩基部や糖部に導入することも可能である。また、リン酸ジエステル結合の間に導入することもできる (Goodchild, J. Bioconjugate Chemistry 1, 165-187(1990))。

【 0 0 1 9 】

本発明においては標識物質から、光吸収性物質への効率的なエネルギー転スファーを引き起こす必要があり、二種の標識はその標識物の組合わせに応じて効率よくエネルギー転スファーを引き起こす位置関係に導入する必要がある。一般的に二種の標識物が近いほどエネルギー転スファーの効率が良いと考えられるが、例外的な場合もありうるのでその位置関係は標識物の組合わせに応じて検討しなければならない (Morrison L. E. Nonisotopic DNA Probe Techniques 311-352, Academic Press Inc. (1992))。

【 0 0 2 0 】

二種の標識物の位置関係を調節する方法としてはオリゴヌクレオチドにおける導入部分をかえることによってもできるし、また、核酸と標識物をつなぐスペーサーの構造や長さを変えることによっても調節できる。この様に標識物の位置関係は標識物質から光吸収性物質へのエネルギー転スファーが起こりうるものでなければならないが、同時に光吸収性物質が形成された二本鎖にインターカレートあるいは結合することを妨げる位置であってはならない。また、オリゴヌクレオチドに蛍光物質を導入すると、オリゴヌクレオチドの塩基配列によって核酸塩基による蛍光の消光が見られる場合があり、本発明においてはその点を考慮する必要がある。ただし、この消光現象も二本鎖を形成することにより解消する場合がある。

【 0 0 2 1 】

本発明によるプローブは、4 塩基以上、好ましくは 8 塩基以上、の核酸からなることができる。

【 0 0 2 2 】

本明細書において「核酸」とは、DNA、RNAのみならず修飾核酸あるいは

PNA（ペプチド核酸）など核酸と二本鎖を形成するものも含まれる。ただし、形成した二本鎖にインターカレーターや二本鎖に特異的に結合する標識が結合できうる構造であることは言うまでもない。

【0023】

本発明によるプローブが標的核酸に完全に相補的な場合には、プローブに導入した光吸収性のインターカレーターあるいは二本鎖核酸と特異的に結合する光吸収性物質が二本鎖核酸と相互作用を起こし、その結果プローブに導入した標識物質の消光がおこらない（図1参照）。一方、プローブが試料とハイブリダイズしないときあるいは試料と不完全にハイブリダイズするときは、プローブに導入した光吸収性のインターカレーターあるいは二本鎖核酸と特異的に結合する光吸収性物質が該二本鎖核酸と相互作用せず、プローブに導入した標識物質の消光がおきる（図1参照）。

【0024】

本発明によるプローブは1塩基のミスマッチも検出できる。すなわち、プローブが試料と1塩基において対合しないときでも二本鎖核酸の構造が変化し、プローブに導入した光吸収性のインターカレーターあるいは二本鎖核酸と特異的に結合する光吸収性物質が該二本鎖核酸と相互作用せず、プローブに導入した標識物質の消光がおきる。

【0025】

ハイブリダイゼーションプロテクション法（Nelson, N. C. et. al. Nucleic Acids Res. 24, 4998-5003 (1988)）においては、アクリジニウムエステルのアルカリによる加水分解のされ易さが、ターゲットがプローブと完全に相補的であるか、一塩基のミスマッチがあるかによって変わってくることが確認されており、一塩基の変異を検出できると考えられる。すなわち、インターカレート剤であるアクリジンは二本鎖が完全に相補的である場合と、一塩基のミスマッチがある場合とでインターカレートのしかたが異なり、アクリジンは完全に相補的な二本鎖とはインターカレートするが、ミスマッチが存在するとインターカレートできないと考えられる。

【0026】

このように、試料中に相補鎖核酸が存在する場合には標識物質からの光放出が光吸収性物質により妨げられない。従って、プローブと試料とを接触させ標識物質からの蛍光等の光放出を測定することにより試料中の相補鎖核酸を検出できる。

【0027】

具体的には、適切な緩衝溶液等を含む溶液中で、本発明によるプローブと検体から調製した核酸とを混合してハイブリダイゼーション操作を行い、反応溶液の蛍光等をそのまま測定し、コントロールと比較すれば試料中にプローブと相補的な配列が存在するかどうか判定することができる。

【0028】

ハイブリダイゼーションの方法や条件は一般的方法に従えばよい (Keller, G. H. et al. DNA Probes Stockton Press (1993))。ハイブリダイゼーション後の検出は、標識物に応じた検出装置を用いて検出することができる。たとえば、標識物が蛍光であれば、蛍光分光光度計等を使うことができる。但し、検体数が多い場合などは蛍光マイクロプレートリーダー等を使えば簡便に行なうことができる。また、後述するように遺伝子チップのように担体に固定したプローブとのハイブリダイゼーションでは担体上の蛍光を蛍光スキャナー等を用いて測定することができる。これらの測定はハイブリダイゼーション後の平衡に達した状態で行なうのが一般的であるが、温度変化に伴う動力学的な測定を行いプローブと試料核酸のより精密な特性を観察することができる (Howell, W.M. et al. Nature Biotechnology 17, 87-88(1999))。すなわち、この方法により、一塩基ミスマッチ等をより正確に検出することが可能になる。

【0029】

本発明において試料核酸はDNAまたはRNAのいずれでもよく、あらゆる生体から抽出したものであっても、粗精製の状態のものであってもよい。また、試料核酸がごく微量の場合は遺伝子増幅法、例えばPCR法などで遺伝子を増幅した後、本発明のプローブとハイブリダイゼーションを行なってもよい。

【0030】

また、温度変化可能で、たくさんの反応容器を備え、その反応容器のまま蛍光

が測定できる装置 (ABI PRISM™ 7700 Perkin-elmer) などを使えばハイブリダイゼーションと測定を一つの容器中で連続して行なうこともできる。

【 0 0 3 1 】

本発明のプローブは、溶液中での均一ハイブリダイゼーションに用いるだけでなく、固相担体に結合した状態で使用することもできる。固相担体に結合した本発明のプローブの調製法としては、検出に用いる固相上でオリゴヌクレオチドを合成する方法と (Fodor, S.P.A. et al. Science 251, 767-773 (1991))、適切な官能基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、そのあと導入した官能基を利用して固相と結合する方法がある (Rasmussen, S.R. Anal. Biochem. 198, 138-142 (1991))。さらには、オリゴヌクレオチドに導入したリガンンドとそのレセプターを固相化した固相との間の結合利用して行なうこともできる (Broude, N. E. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 3072-3076 (1994))。

【 0 0 3 2 】

固相担体としては、マイクロタイタープレート (Rasmussen, S.R. Anal. Biochem. 198, 138-142 (1991)) やスライドグラス (Fodor, S.P.A. et al. Science 251, 767-773 (1991)) あるいは光ファイバーの先端などがある (Ferguson, J. A. Nature Biotechnology 14, 1681-1684 (1996))。

【 0 0 3 3 】

さらに、本発明による固相担体は遺伝子チップであってもよい。遺伝子チップ技術の利用法としては、おもにRNAの発現量を調べるケースと、遺伝子の変異を調べるケースの二つがある (Lander, E. S. Nature Genetics supplement, 21, 3-4 (1999))。本発明のプローブはいずれのケースに関しても有力な方法となりうるが、特に前者において効力を発揮することができる。従来の遺伝子チップはオリゴヌクレオチドや c D N A 等がチップ上に固相化されており (Duggan, D. J. et. al. Nature Genetics supplement, 21, 10-14 (1999), Lipshutz, R. J. Nature Genetics supplement, 21, 20-24 (1999))、ハイブリダイゼーションを検出するためには試料中の核酸を標識する必要がある。一般に遺伝子チップでの検出では遺伝子増幅法を用いて遺伝子を増幅する際に標識物を導入する方法が行われているが、R N A の発現量の定量においては遺伝子増幅により定量性を失っ

てしまうケースが多い。また、RNAは不安定であり、種々の標識反応において分解を起こす危険性が非常に高い。そこで、本発明のプロブをチップ上に固相化すれば、生体等から抽出したmRNAを標識操作などを行うことなくハイブリダイゼーションを行ない検出することができる。このような方法を用いれば遺伝子発現解析は飛躍的に簡易化され、非常に多くの検体を容易に処理することができると考えられる。

【0034】

【実施例】

オリゴヌクレオチドの合成は核酸自動合成装置（DNA/RNAシンセサイザ Model 392、パーキンエルマー社）を用いてフォスフォアミダイト法で行なった。フルオレセインの導入はフルオレセインフォスフォアミダイト（グレンリサーチ、Cat. No.:10-1963）を用いて行った。ピレンの導入はユニリンクTMアミノモディファイアー（クロンテク、Cat. No.:5190-1）を用いてアミノ基を導入し、脱保護した後、1-pyrenebutanoic acid, succinimidyl ester（モレキュラープロブ、Cat. No.:P-130）を反応させることにより行った。非標識のオリゴヌクレオチドはアマシャムファルマシアバイオテク社より購入した。

【0035】

実施例1：フルオレセインおよびピレンを導入したオリゴヌクレオチドの合成

以下に示すアミノ基とフルオレセインを導入したオリゴヌクレオチドを自動合成機を用いて合成した。Fはフルオレセインを示す。修飾部分の具体的構造は図2に示される通りである。また、フルオレセインについては蛍光スペクトルを測定して確認した（励起波長：494 nm、極大蛍光波長：517 nm）。

【0036】

EFN1-F：5' GCAACAGGC (NH₂) (F) CGACAACG（配列番号1）

EFN2-F：5' GCAACAGG (NH₂) C (F) CGACAACG（配列番号1）

EFN3-F : 5' ACGCACAAA (NH₂) (F) ACCAAGCA (配列番号 2)

EFN4-F : 5' ACGCACAA (NH₂) A (F) ACCAAGCA (配列番号 2)

【0037】

脱保護後、変性 20% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて精製した。精製したオリゴヌクレオチド (80 μ g) に 1M NaHCO₃ (4 μ L)、ピレン活性エステル DMF 溶液 (20 μ g/ μ L, 20 μ L)、H₂O (16 μ L) を加え、25℃で 14 時間反応した。反応後、ゲルろ過 (Sephadex G-50, 50mM TEAB バッファー) で過剰の試薬を除き、濃縮後逆相 HPLC (μ Bondapak C18, ウォータース社) で精製した。得られたオリゴヌクレオチドを以下に示す。P はピレン、F はフルオレセインを示し、修飾部分の構造は図 3 に示されるとおりである。ピレンの導入については蛍光スペクトルを測定して確認した (励起波長 : 341 nm、極大蛍光波長 : 383 nm, 400 nm)

【0038】

EFN1-FP : 5' GCAACAGGC (P) (F) CGACAACG (配列番号 1)

EFN2-FP : 5' GCAACAGG (P) C (F) CGACAACG (配列番号 1)

EFN3-FP : 5' ACGCACAAA (P) (F) ACCAAGCA (配列番号 2)

EFN4-FP : 5' ACGCACAA (P) A (F) ACCAAGCA (配列番号 2)

【0039】

実施例 2：フルオレセイン-ピレン標識オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによる蛍光強度の増大

上記 2 種の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドに相補的な下記に示す非標識のオリゴヌクレオチドを用意した。

【0040】

EC 1：5' CGTTGTCGGCCTGTTGC (配列番号 3)

EC 2：5' TGCTTGGTTTTGTGCGT (配列番号 4)

標識オリゴヌクレオチドと非標識オリゴヌクレオチドを下記に示すようにバッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 ng/μL carrier DNA) とともに混合し、二本鎖溶液、およびコントロール溶液を調製した。混合溶液は 94℃ から 34℃ まで 5 時間かけてアニーリングした。

【0041】

【表 1】

表 1

| No. | 標識オリゴヌクレオチド (0.09 μ g/ μ L) | 非標識オリゴヌクレオチド (0.09 μ g/ μ L) | バッファ | H ₂ O | 蛍光強度 |
|-----|----------------------------------------|-----------------------------------------|------------|------------------|-------|
| 1 | EFN1-F: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 256 |
| 2 | EFN1-F: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 542 |
| 3 | EFN1-F: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 282 |
| 4 | EFN2-F: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 525 |
| 5 | EFN2-F: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 823 |
| 6 | EFN2-F: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 589 |
| 7 | EFN3-F: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 1,137 |
| 8 | EFN3-F: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 1,296 |
| 9 | EFN3-F: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 1,095 |
| 10 | EFN4-F: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 1,005 |
| 11 | EFN4-F: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 1,203 |
| 12 | EFN4-F: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 1,125 |
| 13 | EFN1-FP: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 156 |
| 14 | EFN1-FP: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 661 |
| 15 | EFN1-FP: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 160 |
| 16 | EFN2-FP: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 243 |
| 17 | EFN2-FP: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 938 |
| 18 | EFN2-FP: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 269 |
| 19 | EFN3-FP: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 321 |
| 20 | EFN3-FP: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 342 |
| 21 | EFN3-FP: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 985 |
| 22 | EFN4-FP: 10 μ L | なし | 20 μ L | 70 μ L | 510 |
| 23 | EFN4-FP: 10 μ L | EC1: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 508 |
| 24 | EFN4-FP: 10 μ L | EC2: 10 μ L | 20 μ L | 60 μ L | 1,042 |

アニーリングした溶液 (30 μ L) に測定溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 ng/ μ L carrier DNA: 420 μ L) を加えて、Shimadzu RF-5000 を用いて蛍光を測定した ($E_x = 494$ nm, $E_m = 518$ nm)。なお、スケールオーバーしたものについてはさらに希釈して測定し、蛍光強度は原液に換算した。蛍光強度は表中に示し、またグラフ 1 に示した。

【0042】

ピレンの導入されていないものでも相補鎖を形成することによって蛍光強度が高くなっている場合がある (No. 4 および No. 5) これはオリゴヌクレオチドに導入されたフルオレセインの蛍光が、オリゴヌクレオチドとの相互作用により消光されていた状態が相補鎖を形成することによって解放されたためである。

このような、現象は配列に依存する場合が多く、No. 7 から No. 12 では見られない。一方ピレンを導入したものでは、いずれも相補鎖を形成した時のみ蛍光強度が増大しており（No. 13 から No. 24 の No. 14, No. 17, No. 21, No. 24）、本プローブがハイブリダイゼーションによって蛍光強度が増すことを示している。

【0 0 4 3】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gcaacaggcc gacaacg

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

acgcacaaaa ccaagca

17

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

cgttgtcggc ctgttgc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tgcttggttt tgtgcgt

17

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

本発明によるプローブの概略図である。Single Strandedは一本鎖の状態を示す。Double Strandedは二本鎖の状態、すなわち、プローブが標的核酸とハイブリダイズした状態を示す。Fはフルオレセイン等の標識物質、Pはピレン等の光吸収性物質を示す。

【図 2】

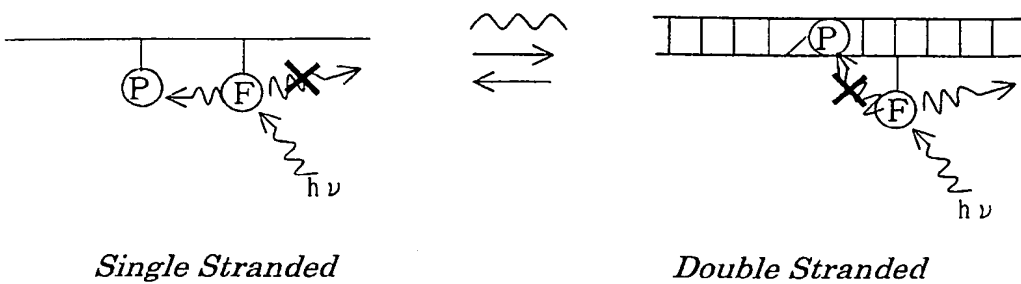
アミノ基とフルオレセインを固定化したオリゴヌクレオチド（EFN1-F、EFN2-F）の修飾部分の具体的構造を示した図である。EFN3-F、EFN4-Fは塩基以外はEFN1-F、EFN2-Fと同様の構造である。

【図 3】

ピレンとフルオレセインを固定化したオリゴヌクレオチド（EFN1-FP、EFN2-FP）の修飾部分の具体的構造を示した図である。EFN3-FP、EFN4-FPは塩基以外はEFN1-FP、EFN2-FPと同様の構造である。

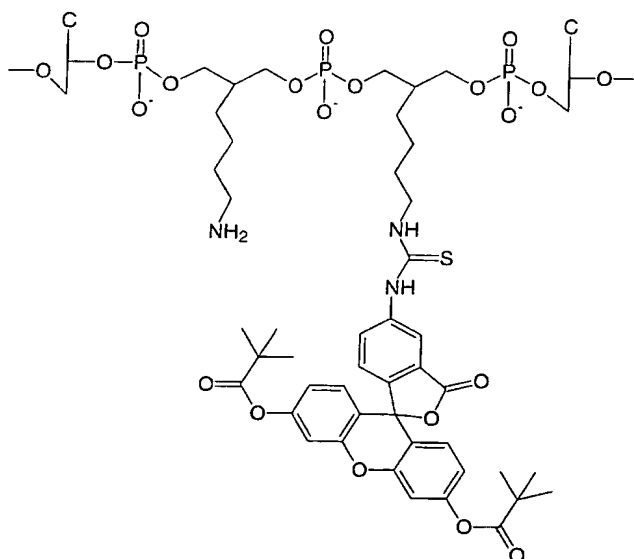
【書類名】 図面

【図 1】

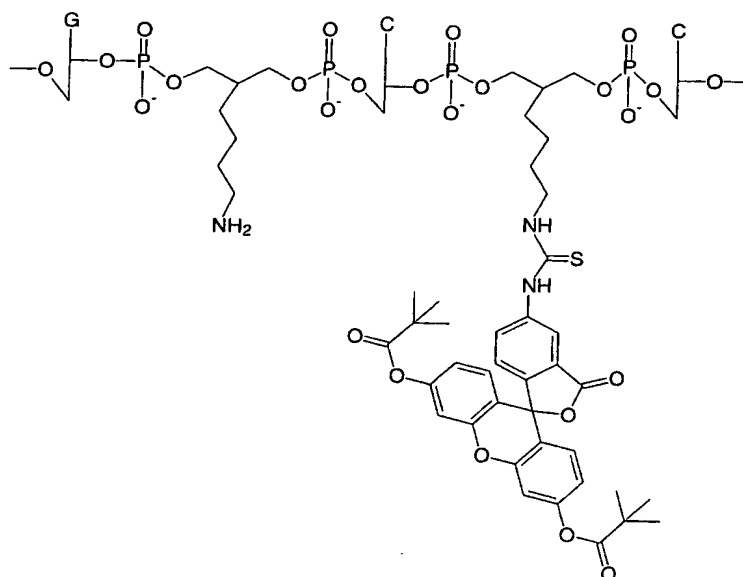


【図 2】

E F N 1 - F

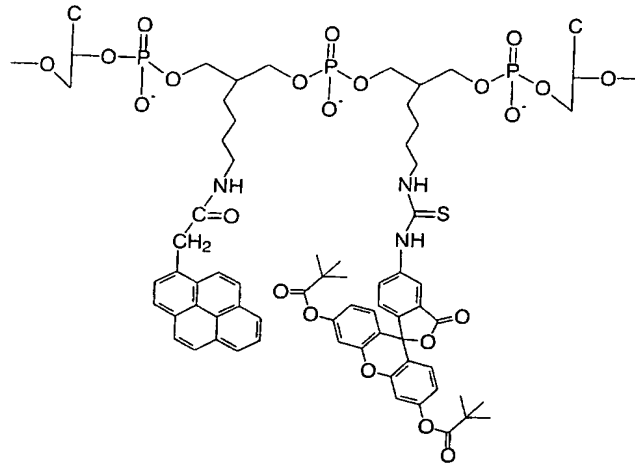


E F N 2 - F

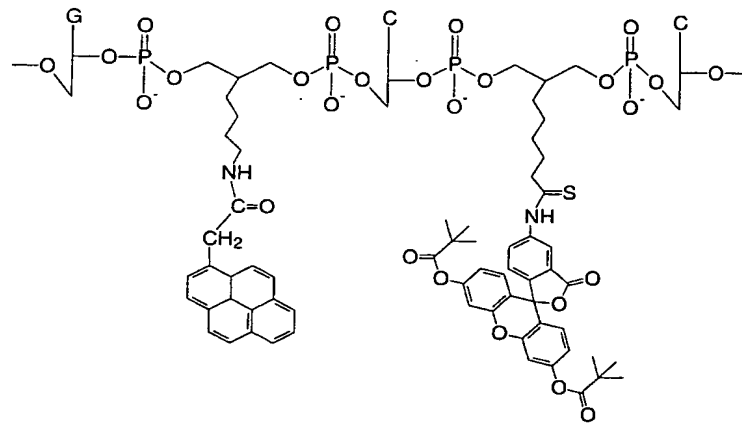


【図 3】

EFN1-FP



EFN2-FP



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡易操作により短時間で高感度に遺伝子を検出できる核酸検出用プローブの提供。

【解決手段】 光を放出する標識物質と、標識物質から放出された光を吸収するがプローブと相補鎖核酸とのハイブリダイゼーションにより光の吸収が妨げられる光吸収性物質とを担持してなる核酸からなるプローブ。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 平成 1 1 年 特許願 第 2 6 8 7 4 5 号
受付番号 5 9 9 0 0 9 2 3 4 4 4
書類名 特許願
担当官 寺内 文男 7 0 6 8
作成日 平成 1 1 年 9 月 2 7 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000250100
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 4 丁目 5 番 3 6 号
【氏名又は名称】 湧永製薬株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100064285
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 - 2 - 3 富士ビル 協
和特許法律事務所内

【氏名又は名称】 佐藤 一雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067079
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 - 2 - 3 富士ビル 協
和特許法律事務所内

【氏名又は名称】 小野寺 捷洋

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許
法律事務所

【氏名又は名称】 中村 行孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 3 丁目 2 番 3 号 協和特許
法律事務所

【氏名又は名称】 横田 修孝

次頁無

特願平 1 1 - 2 6 8 7 4 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 5 0 1 0 0]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 1 0 月 1 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市淀川区宮原 4 丁目 5 番 3 6 号

氏 名

湧永製薬株式会社